

PRODUCTION OF CYTIDINE BY FERMENTATION

Patent Number: JP3228689
Publication date: 1991-10-09
Inventor(s): FURUYA KAORU
Applicant(s):: ASAHI CHEM IND CO LTD
Requested Patent: ☐ JP3228689
Application Number: JP19900025574 19900205
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P19/38
EC Classification:
Equivalents: JP2938497B2

Abstract

PURPOSE:To enable mass-production of cytidine by transforming a specific microorganism with a recombinant DNA containing a cytidine triphosphate synthetase(CTP synthetase) gene and culturing the transformant.

CONSTITUTION:Bacillus natto C-1 strain (A) capable of producing cytidine and having the following bacteriological properties is separated from soil. The shape and size of the cell, bacillus, (0.7-1.0)X(2-8) mum; Gram-positive; reducing nitric acid salt; hydrolyzing starch; etc. The cell of the strain A is extracted and cloned to obtain a CTP synthetase gene (B). The component B is introduced into a vector and the strain A is transformed with the resultant recombinant DNA (C) (e.g. plasmid pFS037) to obtain a recombinant (D). Cytidine is produced by inoculating the strain D on a medium containing glucose, tetracycline, etc., and culturing at about 37 deg.C for about 3 days.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑬ 公開特許公報(A) 平3-228689

⑭ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑮ 公開 平成3年(1991)10月9日

C 12 P 19/38
// C 12 N 1/21
15/32
(C 12 P 19/38
C 12 R 1:07)

8214-4B
7236-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全8頁)

⑯ 発明の名称 発酵法によるシチジンの製造方法

⑰ 特 願 平2-25574

⑱ 出 願 平2(1990)2月5日

⑲ 発 明 者 古 家 加 夫 留 静岡県富士市鰐島2番地の1 旭化成工業株式会社内
⑳ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
㉑ 代 理 人 弁理士 荻上 豊規

明 細 書

1. 発明の名称

発酵法によるシチジンの製造方法

2. 特許請求の範囲

シチジン生産能を有する微生物をC T Pシンセターゼ遺伝子を含む組換え体DNAで形質転換し、得られる形質転換体を培養して培養物中にシチジンを生成蓄積させ、該培養物からシチジンを採出することを特徴とするシチジンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、医薬品等の合成原料として有用なシチジンの発酵法による製造方法に関する。より詳しくは、本発明は、シチジン生産能を有する微生物の形質転換体を使用するシチジンの多量生産方法に関する。

〔従来技術〕

微生物を培養してシチジンを得る方法としては、バチルス・ズブチリス或いはプロテウス・レトグリーの変異株を用いる方法(特公昭36-21499

号公報)；プレバクテリウム属のプリン、ピリミジン及びヒスチジンに対してアナログ耐性の変異株を用いる方法(特公昭57-18871号公報)；ミクロバクテリウム属のプリンに対してアナログ耐性の変異株を用いる方法(特公昭57-18872号公報)；バチルス属のピリミジンに対してアナログ耐性の変異株を用いる方法(特開昭61-135537号公報)等が知られている。

ところで微生物体内におけるシチジンが合成されるに至る代謝経路においては、ウリジン系化合物のウラシル塩基部分がアミノ化されてシチジン系化合物が生成され、該シチジン系化合物からシチジンがもたらされる。この際の反応は、ウリジン三リン酸(以下、UTPという。)のアミノ化によりシチジン三リン酸(以下、CTPという。)が生じる反応が唯一の経路である。この反応を触媒する酵素はシチジン三リン酸合成酵素(以下、CTPシンセターゼという。)であるが、この酵素は生産物であるCTPによるフィードバック阻害をうけること、発現量が培地のシチ

シジン量で抑制されること等、その活性は厳密に調節されている。また、この酵素の遺伝子のクローニングについて、太陽菌由来のCTPシンセターゼ遺伝子〔*Journal of Biological Chemistry* 261, 5568(1986)〕、バチルス・ズブチリス由来のCTPシンセターゼ遺伝子〔*Journal of Bacteriology* 170, 4194-4203(1988)〕の報告がある。

しかしながら、上記クローニングの報告はいずれもCTPシンセターゼ遺伝子の産業上の利用を目的としたものではなく、同酵素遺伝子を微生物を用いて高産に発現させたりしたものでもなく、且つまたそれを利用してシチジンの工業的生産を意図したものでもない。

〔発明の目的〕

本発明は、医薬品等の合成原料として有用なシチジンの発酵法により多量生産できる方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、ランダムな変異にのみ頼っていた従来のシチジン生産菌に代えて、細菌入手法により得られた高シチジン生産能を有するシ

チジン生産菌を使用してシチジンの発酵法による多量生産方法を提供することにある。

〔発明の構成・効果〕

本発明者は、シチジン系化合物の合成系の各種酵素群の中でも特にCTPシンセターゼに着目し、この酵素活性を強化することがシチジン生産量の上昇に寄与すると考え、クローニングしたCTPシンセターゼ遺伝子をシチジン生産菌に組み込み高産に発現させることによって、CTPシンセターゼの発現量が増加し、さらにシチジンの生産量が飛躍的に増加することを見出し、該知見に基づき本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、シチジン生産能を有する微生物をCTPシンセターゼ遺伝子を含む細胞体DNAで形質転換し、得られる形質転換体を培養して培養物中にシチジンを生成蓄積させ、該培養物からシチジンを採取することを経営とするシチジンの製造方法にある。

本発明において使用するシチジン生産能を有する微生物としては、元来シチジン生産能を有して

いる微生物でもよいし、天然或いは人工の変異によって、シチジン生産能が付与された微生物でもよい。このような微生物としては、バチルス・ズブチリス或いはプロテウス・レトグリーの変異株、プレビバクテリウム属細菌から誘導されたプリンアナログ、ピリミジンアナログまたはヒスチジンアナログ耐性株、ミクロバクテリウム属細菌から誘導されたプリンアナログ耐性株、バチルス・ナットウC-1株〔保工研菌寄第11055号〕等が挙げられる。

上記のバチルス・ナットウC-1は、土壌から新しく分類されたシチジン生産能を有する菌であり、その菌学的性状は下記の通りである。

(a) 形態学的性状

- 1) 細胞の形および大きさ：短桿菌、 $0.1\sim 1.0 \times 2\sim 8 \mu$
- 2) 多形性：単一まれに二連
- 3) 運動性：なし
- 4) 胞子：卵型の内生胞子を栄養細胞の中央付近に生じる

5) グラム染色：陽性

6) 抗酸性：陰性

(b) 生育状況

- 1) 肉汁寒天培養：灰白色で周辺が裂開状の扁平なコロニーを作る
- 2) 肉汁液体培養：表面に皮膜を作るが、他は透明

(c) 生理的性質

- 1) 固態培地の還元：有り
- 2) クエン酸の利用：有り
- 3) プロピオン酸の利用：なし
- 4) VPテスト：陽性
- 5) デンプンの加水分解：有り
- 6) カゼインの加水分解：有り
- 7) オキシダーゼ：陽性
- 8)カタラーゼ：有り
- 9) インドールの生成：なし
- 10) 酸素に対する態度：好気性
- 11) ビオチン要求性：有り
- 12) 1.5%グルタミン酸を含む培地で粘性物質の

生成：有り

(13) シチジンの増殖への抽出：有り

なお、このバチルス・ナットウC-1は、平成元年10月19日付で、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌寄第11055号（FERM P-11055）の寄託番号で寄託してある。

シチジンを生産する能力のある微生物よりCTPシンセターゼ遺伝子をクローニングする方法としては以下の方法を用いて取得することができる。

(1) シチジン生産能を有する微生物の遺伝子を発現させることが可能で且つCTPシンセターゼが欠損した微生物に、シチジン生産能を有する微生物の全DNAライブラリーを導入し、シチジンを生育に要求しなくなることを目印にコロニーを選択し、そのコロニーよりDNAライブラリーを回収する方法。

(2) シチジン生産能を有する微生物のCTPシンセターゼを精製し、そのアミノ酸配列の一部より

を編み込む。このとき、目的遺伝子が染色体あたり複数編み込まれるれば、CTPシンセターゼ遺伝子をそのまま組み込んでも良い。

CTPシンセターゼ遺伝子の改良としては、同酵素は増殖中のシチジンによって阻害をうけることから、遺伝子プロモーターを構成的な（いつも発現している）ものに置換すること、或いは同酵素はCTPによるフィードバック阻害をうけることから同酵素のアロステック部位をコードしている部分に変異を入れ、CTP非感受性の酵素を造成すること等が挙げられる。

このようにして得られた細胞体を含む微生物のうち、性質の安定した株を選び、通常の微生物の培養と同様の方法で培養を行なう。即ち、増殖としては、炭素源、窒素源、菌の生育に必要な各種の無機塩類、アミノ酸類、ビタミン類等が適宜選択の上、それぞれ単独もしくは混合して用いられる。増殖中にpHの変動が観察される場合、炭酸、炭酸カルシウム、水酸化ナトリウム、アンモニア水等を適宜添加する。また、増殖中にウラン

限定される遺伝子のDNA配列をもつオリゴヌクレオチドと相補性を示すものを、シチジン生産能を有する微生物のDNAライブラリーより選択する方法。

(3) シチジン生産能を有する微生物の近縁の微生物のCTPシンセターゼがクローニングされている場合、これと相補性を示すものを、シチジン生産能を有する微生物のDNAライブラリーより選択する方法。

このようにして得たCTPシンセターゼ遺伝子をそのまま、既には改良を加えた後、シチジン生産能を有する微生物中で高発現させる。その方法としては、以下の方法を用いることができる。

(1) 宿主-ベクター系の確立した微生物では、CTPシンセターゼ遺伝子をこのベクターに組み込む。このとき、このベクターが高いコピー数を持っていれば、同遺伝子をそのまま組み込んでも良い。

(2) 染色体に目的遺伝子を組み込む方法が確立した微生物では、染色体に直接CTPシンセターゼ

ル、クリジン、UMP等の化合物を多量に入れ、これをシチジンにサルベージ合成させる方法も有効である。培養温度は、20℃-48℃の範囲において、使用する微生物の生育、シチジンの蓄積量、副産物の抑制を考慮に入れ、適宜選択できる。培養時間としては、シチジンの蓄積量、副産物の生産量によって異なるが、通常1日〜7日である。

培養物からシチジンを分離精製する方法は、沈殿法、イオン交換樹脂による処理、或いは相転による抽出等の公知の方法を用いることができる（特開昭51-135597号公報参照）。

実施例

以下に実施例を挙げて、本発明を具体的に説明する。

実施例1

【工程1】

バチルス・ナットウC-1株（微工研菌寄第11055号）からの全DNAの抽出。

シチジン産生遺伝子の配列法にかわり10%PEG沈降法を用いる以外は同村らの方法（微生物遺伝学

実験法, 106 頁共立出版社) によってバチルス・ナットウ C-1 株の菌体 7 g より 3.13 mg の全 DNA を抽出精製した。

〔工程 2〕

全 DNA ライブラリーの作製

工程 1 で得た全 DNA に、制限酵素 *Pst* I を作用させ完全分解後、1 % アガロースゲル電気泳動に供し、6 ~ 9 kb の大きさに相当するゲル部分より、電気溶出法により DNA 断片を回収した。この回収 DNA 2 μ g と、*Pst* I で完全に開裂させた 600 ng のベクター PUC18 を混合し、T4・DNA リガーゼで 15℃、12 時間反応させ、両 DNA を結合させた。

この組換え体 DNA を *CaCl₂* を用いた形質転換法 [モレヌラー・クローニング, 349 頁, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー] により、エシェリヒア・コリ MB65 (微生物園第 8900 号) に導入し、アンピシリン 50 μ g / ml を含む LB-ブロス寒天培地 [バクトトリブトン (ディフコ社製) 1 %, 酵母エキス 0.5 %, NaCl

0.5 %, 寒天 1.5 %] 上で生育してきた 6808 コロニーを 4 等分し集め、バーンボイムらの方法 [Nucleic Acid Research, 7, 1513 (1979)] によりプラスミド DNA を調製し、バチルス・ナットウ C-1 の染色体ライブラリーとした。

〔工程 3〕

DNA ライブラリーから CTP シンセターゼ・クローンの選択・分離

工程 2 で得た染色体ライブラリー DNA を *CaCl₂* を用いた形質転換法により、CTP シンセターゼを欠損したエシェリヒア・コリ JF 618 [CGSC5566 株: 米国イェール大学, E. Coli genetic stock center] に導入し、アンピシリン 80 μ g / ml を含み、シチジンを含まない M9 培地 [Na₂HPO₄ 6g / l, KH₂PO₄ 3g / l, NaCl 0.5g / l, NH₄Cl 1g / l, 2mM MgSO₄, 0.1mM *CaCl₂*, 200 μ g / ml スレオニン, 30 μ g / ml ロイシン, 50 μ g / ml プロリン, 20 μ g / ml ヒスチジン, 20 μ g / ml アルギニン, 2 μ g / ml チアミン, 20 μ g / ml ウラシル] で生育する株を選択し、前出の

バーンボイムらの方法により 7.6 kb のバチルス・ナットウ由来の DNA 断片を含むプラスミド DNA を回収した。このプラスミドを *Bam*HI 及び *Pvu* II で切断することにより得られるバチルス・ナットウ C-1 由来の 3.0 kb の断片をアガロースゲル電気泳動後 1 μ g 回収し、バチルス・ズブチリス及びエシェリヒア・コリ用シャトルベクター pHY300PLX [タカラ造薬製] を *Bam*HI 及び *Sma*I で切断した 4.9 kb の DNA 断片 200ng と混合し、T4 DNA リガーゼで 15℃、12 時間反応させ、両 DNA を結合させた。この組換え体 DNA を *CaCl₂* を用いた形質転換法によりエシェリヒア・コリ JF 618 に導入し、アンピシリン 80 μ g / ml を含み、シチジンを含まない M9 培地で選抜することにより、目的の 7.9 kb を有するプラスミドを得た。

このプラスミド pFS037 は、JF618 の CTP シンセターゼ欠損を安定に補償することにより、バチルス・ナットウ C-1 由来のこの 3.0 kb 断片に CTP シンセターゼ遺伝子は含まれていると証明した。

〔工程 4〕

バチルス・ナットウ C-1 由来 CTP シンセターゼ遺伝子の塩基配列決定

同 3.0 kb の DNA 断片の配列をサンガーらの方法 [Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463 (1977)] により決定した (第 2 図)。その結果、バチルス・ズブチリスの CTP シンセターゼと同一のアミノ酸をコードする部分が存在した。しかし、その塩基配列はバチルス・ズブチリスのそれとは異なりその遺伝子番号の運用制度は第 1 表に示す通りバチルス・ナットウ C-1 固有のものであった。また、プロモーター領域、ターミネーター領域もこの株に固有のものであった。

〔工程 5〕

バチルス・ナットウ C-1 由来の CTP シンセターゼ遺伝子をプローブとした染色体 DNA とのサザンハイブリダイゼーション

制限酵素 *Dra*I 及び *Kcc*I で切り出したバチルス・ナットウ CTP シンセターゼをコードする領域を含む 1.8 kb の DNA 断片 (第 2 図参照) をブ

ローブ (ブローブ I) として、バチルス・ナットウ C-1 の染色体を *Pst*I、*Hind*III で切断した DNA とサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、*Pst*I 切断の 7.6kb、*Hind*III 切断の 0.5kb の予想された位置にバンドを生じた。また、終上コドンの 40bp 下流の *Acc*I 認識部位より下流の 540bp の DNA 断片 [第 2 図参照] をブローブ (ブローブ II) とした場合には *Pst*I 断片の 7.6kb の予想された位置にバンドを生じた。このことから今回のクローニングした 3.0kb の断片がバチルス・ナットウ C-1 由来であることが確かめられた。一方、同実験をバチルス・ズブナリス 169 株 (米国オハイオ大学、*Bacillus Genetic stock center* [A] 株) の染色体を用いて行なった。ブローブ I を用いたところ、*Hind*III 切断の 0.5kb の予想された位置にバンドを生じたがブローブ II では、*Pst*I、*Hind*III、*Eco*RI のいずれで切断した DNA にも、バンドが検出されなかった。

〔工程 6〕

プラスミド pFS037 のバチルス・ナットウ C-1

ラサイクリン $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む EED 液体培地 (グルコース 2%, NaCl 0.25%, ポリペプトン (和光純薬) 1%, イースト・エキス D3 (和光純薬) 1%, ビオチン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ウラシル $100 \mu\text{g}/\text{ml}$, pH7.3) 50 ml に 1 白金耳接種し、 37°C 18 時間培養する。この培養液 5 ml より集菌し、 2 ml のホモジネートバッファー (トリス・塩酸 20mM (pH8.0), EDTA 1mM , ATP 1mM , メルカプトエタノール 20mM , グルタミン 2mM) に懸濁後、水中、超音波処理を施し、菌体ホモジネートを得る。これを等量の 2×反応バッファー (トリス・塩酸 50mM (pH8.0), MgCl_2 25mM , UTP 10mM , ATP 5mM , GTP 1mM , グルタミン 20mM , EDTA 1mM) と混合し、 37°C 5 分間加熱後、3 分間煮沸して反応を停止させる。この反応液を HPLC 分析 (ワットマン SAX-10、25 カラム、0.4M リン酸-2.5% アセトニトリルバッファー (pH3.3)、流速 $1 \text{ ml}/\text{min}$ 、波長 291nm で検出) し、生成した CTP を定量し、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の CTP を生成する活性を 1 unit と定義する。

への導入

エシェリヒア・コリ pFS037/JF618 よりパーンボイムらの方法により抽出した $15 \mu\text{g}$ の pFS037 を山根らのプロトプラストを用いる方法 [遺伝子工学、P173、共立出版、1987 年] でバチルス・ナットウ C-1 株に導入し、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のネトラサイクリン耐性となったコロニーを 43 得た。パーンボイムらの方法で、5 コロニーのプラスミドを抽出し、*Bam*HI および *Eco*RI で切断し、アガロースゲルで泳動パターンを見たが、いずれも pFS037 と同一のパターンであった。

これら 5 コロニーのうちの 1 つを、バチルス・ナットウ C-1 (pFS037) として、平成 2 年 1 月 29 日付で、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研密特第 11211 号 (FEMS P-11211) の寄託番号で寄託してある。

〔工程 7〕

pFS037 を持つバチルス・ナットウ C-1 の CTP シンセターゼ活性

pFS037 を持つバチルス・ナットウ C-1 をネト

その結果、pFS037 を持つバチルス・ナットウ C-1 はホモジネートタンパク 1mg 当たり $118.6 \times 10^{-4}\text{units}$ であるのに対し、バクテリアである pHY 300PLK のみを持つバチルス・ナットウ C-1 は、 $10.5 \times 10^{-4}\text{units}$ であった。

このようにして、約 30 コピーのプラスミド pHY 300PLK 上に CTP シンセターゼ遺伝子を組込み、バチルス・ナットウ C-1 に導入することにより、10 倍以上の CTP シンセターゼ活性の上昇が確認された。

〔工程 8〕

pFS037 を持つバチルス・ナットウ C-1 を用いたシチジン生産

pFS037 を持つバチルス・ナットウ C-1 をネトラサイクリン $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む SEED 液体培地で、 37°C 18 時間培養後、ネトラサイクリン $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含むシチジン生産培地 (グルコース 10%, CaCl_2 1%, イーストエキス D3 (和光純薬) 0.5%, KH_2PO_4 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 0.4%, ビオチン $100 \text{ ng}/\text{ml}$, pH7.2) 50 ml に 2

%接種し、500 μ g/フラスコ中、37℃3日間培養したところ、0.24 μ g/ μ gのシチジンを蓄積されていることが確認された。

なお、対照として工種 I に記載のパチルス・ナットウ C-1 をテトラサイクリンを含まない以外は同じ条件で培養したところ、シチジンの蓄積量は 0.10 μ g/ μ g であった。

実施例 2

実施例 1 で得られた pFS037 を持つパチルス・ナットウ C-1 を、培養液にウラシル 2 μ g/ μ g を含む以外は実施例 1 の条件で培養したところ、培地中のシチジン蓄積量は 0.41 μ g/ μ g であった。

対照としてパチルス・ナットウ C-1 をテトラサイクリンを含まないこと以外は上記と同じ条件で培養したところ、培地中のシチジン蓄積量は 0.12 μ g/ μ g であった。

発明例 1

pFS037 を持つエシェリヒア・コリ JF618 の CTP シンセターゼ活性

実施例 1 で得た pFS037 を持つエシェリヒア・コ

リ JF618 をアンピシリン 50 μ g/ μ g を含む LB-ブロス液体培地 100 μ l に 1 白金菌播菌し、37℃で、16 時間培養する。この培養液 100 μ l より凍菌し、あとはパチルス・ナットウ C-1 の例と同様に CTP シンセターゼ活性を測定する。その結果、pFS037/JF618 はホモジネートタンパク 1 μ g 当たり 103×10^{-3} units であるのに対し、pHY300pL K のみを持つエシェリヒア・コリ JF618 は、 3.7×10^{-3} units であった。このようにパチルス・ナットウ C-1 CTP シンセターゼ遺伝子は、異種生物中での高発現も可能である。

以下余白

第 1 表 (その 1)

2F7-7C/種	使用頻度	
	ATG-A-TAG	ATG-A-TAG
TAT-Phe	5(1.12%)	5(1.12%)
TTC-Phe	14(2.61%)	14(2.61%)
TTA-Leu	8(0.56%)	8(0.56%)
TTC-Leu	8(1.68%)	8(1.68%)
CTT-Leu	18(3.54%)	20(3.73%)
CTC-Leu	5(0.93%)	4(0.75%)
CTA-Leu	1(0.19%)	1(0.19%)
CTG-Leu	7(1.31%)	7(1.31%)
ATT-Ile	19(3.54%)	19(3.54%)
ATC-Ile	22(4.10%)	22(4.10%)
ATA-Ile	0(0.00%)	0(0.00%)
ATG-Met	10(1.87%)	10(1.87%)
GTT-Val	13(2.43%)	14(2.61%)
GTC-Val	9(1.68%)	8(1.53%)
GTA-Val	12(2.24%)	11(2.05%)
GTC-Val	11(2.05%)	11(2.05%)
GCT-Ser	7(1.31%)	7(1.31%)
TCT-Ser	3(0.56%)	3(0.56%)
TCA-Ser	8(1.49%)	8(1.49%)
TCC-Ser	0(0.00%)	0(0.00%)
CCT-Pro	8(1.49%)	8(1.49%)
CAC-Pro	0(0.00%)	0(0.00%)
CCA-Pro	4(0.75%)	4(0.75%)
CCG-Pro	11(2.05%)	11(2.05%)
ACT-Thr	2(0.37%)	2(0.37%)
ACC-Thr	2(0.37%)	2(0.37%)
ACA-Thr	20(3.73%)	20(3.73%)
ACG-Thr	7(1.31%)	7(1.31%)
GCT-Ala	7(1.31%)	7(1.31%)
GCC-Ala	1(0.19%)	1(0.19%)
GCA-Ala	8(1.49%)	8(1.49%)
GCG-Ala	13(2.43%)	13(2.43%)

第 1 表 (その 2)

2F7-7C/種	使用頻度	
	ATG-A-TAG	ATG-A-TAG
TAT-Tyr	6(1.12%)	6(1.12%)
TAC-Tyr	14(2.61%)	14(2.61%)
TAA-Arg	1(0.19%)	1(0.19%)
TAG-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
CAT-His	3(0.56%)	3(0.56%)
CAC-His	9(1.68%)	9(1.68%)
CAG-His	10(1.87%)	10(1.87%)
CAG-Gln	10(1.87%)	10(1.87%)
ACT-Asn	4(0.75%)	4(0.75%)
AAC-Asn	18(3.54%)	18(3.54%)
AAT-Lys	23(4.41%)	23(4.41%)
AAG-Lys	8(1.49%)	8(1.49%)
GAT-Asp	16(2.98%)	16(2.98%)
GAC-Asp	15(2.80%)	15(2.80%)
GAA-Glu	32(6.07%)	32(6.07%)
GAG-Glu	14(2.61%)	14(2.61%)
TGT-Cys	3(0.56%)	3(0.56%)
TGC-Cys	4(0.75%)	4(0.75%)
TGA-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
TGG-Trp	2(0.37%)	2(0.37%)
CGT-Arg	6(1.12%)	6(1.12%)
CAC-Arg	12(2.24%)	12(2.24%)
CAG-Arg	1(0.19%)	1(0.19%)
CGG-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
ACT-Ser	0(0.00%)	0(0.00%)
AGC-Ser	8(1.49%)	8(1.49%)
AGA-Arg	2(0.37%)	2(0.37%)
AGG-Arg	0(0.00%)	0(0.00%)
GCT-Gly	7(1.31%)	7(1.31%)
GCG-Gly	19(3.54%)	19(3.54%)
GGA-Gly	14(2.61%)	14(2.61%)
GCG-Gly	5(0.93%)	5(0.93%)
全コドン数	536	536

〔発明の効果の概要〕

本発明によると、CTPシンセターゼ遺伝子を含む組換え体DNAで形質転換された微生物を用いることによって、シチジンの生産性が顕著に上昇する。また、培養液中にウラシル系化合物を入れた場合、ピリミジンサルベージ系路により、シチジン系化合物の蓄積量がさらに増加する。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、バチルス・ナットウC-1由来のCTPシンセターゼ遺伝子を含むプラスミドpFS037 構築の概略図である。

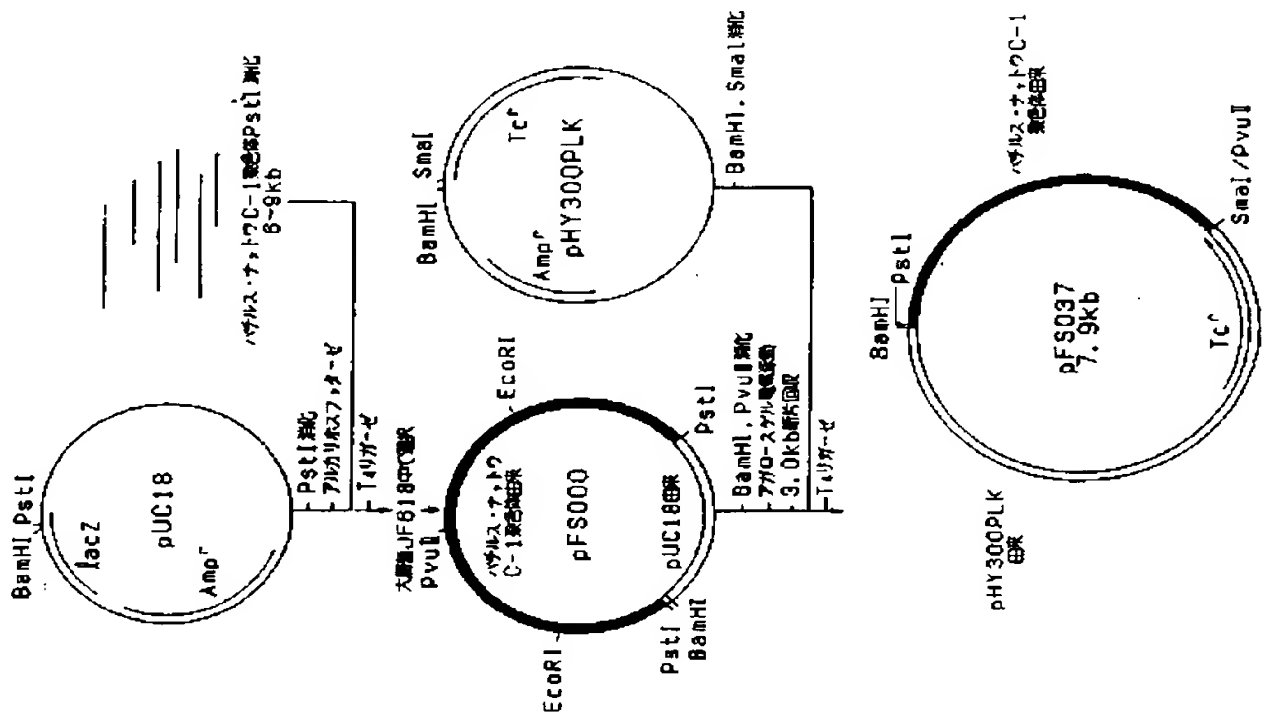
第2図は、バチルス・ナットウC-1由来のCTPシンセターゼ遺伝子の塩基配列を示す。

特許出願人 加化成工業株式会社

代理人 井田士 萩 上 豊 利



第1図



— 682. —